

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1933

N°

73

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1933

PAR

BERNAD Marc

Né le 19 Juin 1907, à Oued-Imbert, ORAN (Algérie)

Recherches Expérimentales sur le Charbon du Chien

JURY

Président : M. R. DEBRÉ, Professeur à la Faculté de Médecine.

Assesseurs : M. PANISSET.

M. ROBIN.

} Professeurs à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1933

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR LE CHARBON DU CHIEN

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1933

No

73

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1933

PAR

BERNAD Marc

Né le 19 Juin 1907, à Oued-Imbert, ORAN (Algérie)

Recherches Expérimentales
sur le Charbon du Chien

JURY

Président : M. R. DEBRÉ, Professeur à la Faculté de Médecine.

Assesseurs : M. PANISSET.

M. ROBIN.

} Professeurs à l'Ecole Nationale Vétéri-
naire d'Alfort.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1933

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Directeurs honoraires : MM. P.-J. CADIOT et H. VALLÉE

Directeur : M. E. NICOLAS

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général honoraire des Ecoles Vétérinaires, P.-J. CADIOT, H. VALLÉE.

PROFESSEURS ET CHARGES DE COURS

	MM.
Anatomie descriptive des animaux domestiques.....	BRESSOU.
Physiologie, thérapeutique générale.....	MAIGNON.
Physique et Chimie médicales, toxicologie, pharmacie.	NICOLAS.
Parasitologie et maladies parasitaires, clinique ; Zoologie	HENRY.
Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, clinique ; sémiologie et propédeutique, jurisprudence	ROBIN.
Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, clinique ; anatomie chirurgicale, médecine opératoire et ferrure.....	COQUOT.
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, clinique ; médecine opératoire, obstétrique.....	LESBOUYRIES.
Pathologie générale et microbiologie, maladies microbiennes et police sanitaire, clinique.....	PANISSET.
Histologie et embryologie, anatomie pathologique ; autopsies	PETIT.
Zootecnie et économie rurale.....	DECHAMBRE
Agronomie, botanique et hygiène ; matière médicale..	SIMONNET.
Industrie et contrôle des produits d'origine animale...	VERGE.

PROFESSEUR AGREGÉ

M. LESBOUYRIES.

CHEF DE TRAVAUX AGREGÉ

M. SIMONNET.

CHEFS DE TRAVAUX

MM. MONVOISIN, MOUSSU (R.), VALADE, GORET, BRION, BERTHELON,

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.



A MA GRAND'MÈRE

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

Faible témoignage de ma vive affection et de ma reconnaissance.

A MA SŒUR

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A MON AMI PIERRE GORET
Chef de travaux à l'Ecole d'Alfort

A MONSIEUR LE PROFESSEUR DEBRE

Qui nous a fait le très grand hon-
neur d'accepter la présidence de notre
jury.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PANISSET
Chevalier de la Légion d'Honneur

A MONSIEUR LE PROFESSEUR ROBIN
Chevalier de la Légion d'Honneur

Mes juges ; qu'ils daignent agréer
ici l'expression de ma reconnaissance
pour le grand honneur qu'ils nous font
de vouloir bien faire partie de notre
jury.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LE CHARBON DU CHIEN

Avant-Propos

Les moutons algériens, quoique plus résistants au charbon bactérien, sont cependant susceptibles de contracter la maladie. Les cas relatés en sont rares ; l'affection sévit sous une forme sporadique un peu particulière, à évolution très rapide (parfois quelques heures). La fièvre charbonneuse ne constitue pas un danger sérieux pour l'élevage du mouton, quoique dans certains cas de véritables épizooties apparaissent en quelques endroits.

Toutefois, le danger paraît si peu réel à certains éleveurs d'Algérie que ceux-ci s'opposent systématiquement à la pratique de la vaccination chez le mouton, sauf dans les cas d'épizooties graves. Le cheval et le bœuf payent à la maladie un plus lourd tribut que le mouton, toutes proportions gardées et relativement au nombre respectif des uns et des autres animaux.

L'évolution foudroyante de la maladie, l'absence de signes cliniques et des lésions caractéristiques observées en général, empêche le berger et même l'éleveur de penser à l'infection charbonneuse chez le mouton, et le vétérinaire n'est pas appelé à intervenir pour des cas se présentant si rarement et affectant seulement un ou deux animaux à intervalles très éloignés.

On comprend donc, pour ces raisons, que des cadavres charbonneux puissent être abandonnés sans précaution, mal enfouis, et livrés aux chiens et aux chacals.

Il apparaît que ces animaux pourraient être susceptibles de disséminer l'infection par l'intermédiaire des matières excrémentitielles renfermant des spores.

M. le Professeur PANISSET nous a donné l'idée de vérifier si, pratiquement, les fèces de ces animaux réputés réfractaires pouvaient constituer un danger et plus particulièrement d'étudier pendant combien de temps les spores charbonneuses pouvaient séjourner dans l'intestin du chien et par conséquent être répandues par cet animal.

Nous ne visions que cette question au début de nos recherches, au laboratoire où M. PANISSET nous accueillit. Cependant, pris par notre sujet, intéressé par la pratique de la bactériologie et sous l'instigation de notre jeune maître et excellent ami, Pierre GORET, chef de travaux à l'Ecole d'Alfort, nous avons entrepris en commun une suite de recherches sur le charbon expérimental du chien qui se sont étagées sur deux années consécutives. De la sorte, la question de la présence des spores charbonneuses dans les excréments des chiens ayant-ingéré des cadavres infectés ne constitue plus qu'un court chapitre de notre travail.

Pris par le temps, nous sommes tenus de présenter dès maintenant notre thèse. Cependant, beaucoup de points que nous avons notés ici, sont encore incomplètement traités et exigent des recherches ultérieures: on pourra nous reprocher d'autre part d'avoir insuffisamment vérifié quelques résultats. De nouvelles recherches sont maintenant entreprises et elles seront poursuivies et publiées dans la suite.

Nous ne pouvons commencer notre travail sans remercier ici M. le Professeur PANISSET, maître accueillant, qui ne nous a pas ménagé ses conseils et nous a toujours manifesté un bienveillant intérêt.

C'est de concert avec mon ami Pierre GORET et sous sa direction que nous avons exécuté ces recherches. Il a mis sans relâche à notre disposition ses connaissances des choses de la bactériologie et du laboratoire; qu'il soit assuré de notre affectueuse gratitude.

Enfin, que notre ami CAMARA veuille trouver ici l'assurance de notre bonne amitié et croire à nos remerciements sincères pour son excellente et fidèle collaboration.

Introduction

Les carnassiers opposent en général à l'infection charbonneuse une résistance assez considérable. Le chien, en particulier, passe pour un animal réfractaire. Dans les conditions naturelles, il est vrai, le chien ne contracte qu'exceptionnellement la maladie. A peine peut-on trouver dans la littérature quatre ou cinq descriptions de charbon spontané chez cet animal, et encore s'agit-il d'animaux en état de moindre résistance et de bactériidies particulièrement virulentes.

Dans les conditions expérimentales, le chien est un animal qui contracte difficilement le charbon et tous les auteurs qui se sont attachés à lui donner la maladie ont utilisé à tout coup des artifices de laboratoire, alliés à l'emploi de souches très virulentes.

Il nous paraît inutile de rappeler ici les nombreuses tentatives suivies la plupart du temps de plein succès, des différents auteurs. Au surplus en trouvera-t-on une analyse complète dans l'ouvrage de MARTEL (1890) et les publications relativement récentes de SANI (1917 et 1925). Notons cependant que dès les difficultés des premiers passages vaincues, MARTEL a réussi à donner de façon relativement facile et en série, l'infection au chien.

Les travaux récents de BESREDKA sur l'infection locale et la sensibilité de la peau au virus charbonneux ont soulevé de nombreuses controverses et poussé les chercheurs à de nouvelles études. On sait que pour BESREDKA la peau est le tissu le plus sensible vis-à-vis de l'infection charbonneuse. Cette concep-

tion a permis d'inaugurer une méthode nouvelle de vaccination qui a fait depuis longtemps ses preuves. Toutefois, d'autres auteurs ont montré que, sans léser la peau, il était possible de donner l'infection par d'autres voies. Certains tissus se montreraient même plus sensibles que le tissu cutané, ainsi le cerveau (CERNAIANU et SUHATZEANU) et le testicule (LANFRANCHI et CASALOTTI). Ces expériences ont eu l'avantage d'ouvrir des horizons un peu nouveaux dans le domaine expérimental en insistant sur l'influence déjà connue de la voie d'introduction du virus dans les infections et en faisant ressortir la sensibilité particulière de certains tissus, ce qui ouvre la voie à de nouvelles recherches.

Il n'est pas douteux, au surplus, que certains tissus soient susceptibles de sensibiliser l'organisme à l'action de germes, vis-à-vis desquels celui-ci est parfois réfractaire.

Dans des recherches récentes, HEYGELI se basant sur l'électivité de nombreux germes pour la rate, a renforcé la virulence du *B. Suicepticus* par des passages en bouillon additionné d'émulsion de rate.

Le phénomène de DURAND REYNALS, qu'a particulièrement étudié PIJOAN, consiste en un renforcement de la virulence des germes. D'autre part, CERRUTI a conféré le charbon au chien par inoculation d'émulsion de bactériidies dans des extraits de thyroïde, de testicule et de muscle qui se comportent donc comme des substances sensibilisantes.

Dès 1925, SANI, vérifiant la sensibilité du tissu testiculaire au virus charbonneux, donnait très facilement l'infection au chien par cette voie et constatait que la voie musculaire donnait aussi de bons résultats, alors que les inoculations dans les autres tissus étaient les moins capables de donner la mort. Il en conclut que la peau n'est pas le seul tissu présentant une grande sensibilité au virus charbonneux. Par contre, il constate que, quelle que soit la voie choisie pour la première inoculation, celle-ci, lorsqu'elle n'est pas

mortelle, confère l'immunité à l'animal éprouvé avec des doses dix fois mortelles de virus par la voie testiculaire.

Les expériences de SANI ne portèrent que sur un petit nombre d'animaux et furent effectuées avec une bactéridie de virulence non exaltée pour le chien. Aussi, avons-nous entrepris dans ce travail d'étudier systématiquement la sensibilité respective de la peau et du testicule chez le chien, la valeur de l'immunité conférée par l'inoculation dans divers tissus de deuxième vaccin pastorien.

D'autre part, nous avons étudié les caractères particuliers que présente la bactéridie passée en série sur l'organisme du chien.

Par ailleurs, on sait que le chien fait partie de la série des animaux résistants ou réfractaires qui, dévorant des cadavres charbonneux, sont susceptibles de semer avec leur déjection les spores charbonneuses qu'ils ont ingérées avec la chair des animaux. SANI a pu mettre en évidence des bactéridies virulentes dans les matières fécales des chiens alimentés avec des viandes charbonneuses trente-deux jours après l'ingestion. Nous avons repris ces recherches en utilisant une technique différente et fait quelques constatations qui diffèrent de celles de SANI quant à la durée du séjour dans l'intestin et à l'altération subie par la bactéridie ou par sa spore dans ce milieu.

1) TECHNIQUE GÉNÉRALE ET MATÉRIEL UTILISÉ

Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé une souche très virulente de bactéridies charbonneuses, mise à notre disposition par MM. Urbain, Lanfranchi et Goret, que nous remercions ici de leur obligeance (1).

Cette souche est capable de tuer le rat blanc à la dose de 1/125.000 de cc.

(1) URBAIN, LANFRANCHI et GORET, L'infection charbonneuse chez le rat blanc. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1931, CVII, 208.

En général, les passages de chien à chien se faisaient rarement par le sang du cœur des animaux infectés, mais toujours à partir d'une culture séparant deux inoculations, comme le conseille Martel. Les injections de sang n'ont été tentées qu'à titre d'essai. Nous avons utilisé les cultures sur gélose, d'un contrôle plus facile que les cultures sur milieux liquides. Cependant, à chaque passage nous ensemencions un tube de bouillon.

Pour la recherche des qualités sporogènes d'une souche, nous avons utilisé la technique suivante : on ensemence un tube d'eau peptonée qu'on laisse quarante-huit heures à l'étuve à 37°. Au bout de ce temps, le tube est porté au bain-marie à 75° pendant 10 minutes, on laisse refroidir et on ensemence à partir de l'eau peptonée deux tubes de gélose, qu'on examine quarante-huit heures après.

L'inoculation intra-dermique n'offre aucune difficulté. Au contraire, l'injection intra-testiculaire, assez douloureuse, nécessite une bonne contention du chien. Il est préférable, dans les deux cas, d'utiliser une aiguille courte.

I. — Transmission expérimentale du charbon au chien par la voie cutanée

EXPÉRIENCE I. — Le 13 octobre 1932, une chienne (N° 1) de 11 kilos reçoit dans la peau du dos, en six points différents, 3/4 de cc. d'émulsion dans 10 cc. de bouillon d'une culture totale de vingt-quatre heures sur gélose de la souche très virulente envisagée plus haut.

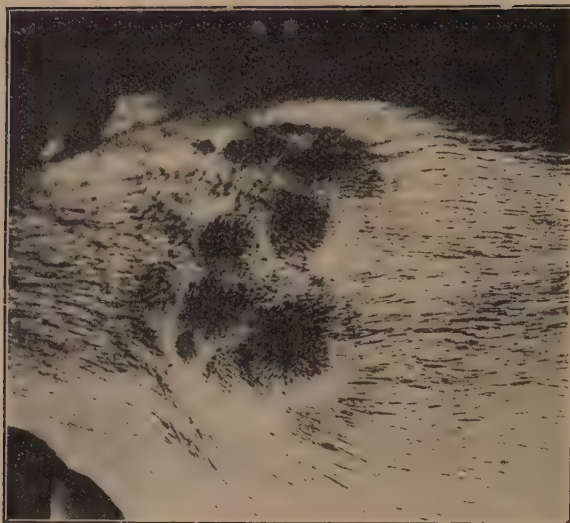
Le 14 octobre, la température s'élève à 41° et l'on note au niveau des points d'inoculation la formation de pustules rosées à centre plus foncé. De façon à nous rendre compte s'il existe une bactériémie à la période favorable d'hyperthermie et pour posséder d'autre part une bactériémie ayant déjà séjourné dans l'organisme du chien, on opère une ponction aseptique du cœur et un ensemencement sur gélose et bouillon à partir du sang. Nous obtenons directement une souche de premier passage qui tue le cobaye en quarante-huit heures. Les lésions pustuleuses s'accroissent dans les jours qui suivent, alors que, dès le 15 octobre, la température redevient normale.

Cette chienne reçoit de nouveau, le 19, une même quantité et par la même voie, mais en un point différent, de virus de premier passage (CH 15 X). L'animal réagit de nouveau par une élévation nette de la température (41°), la formation de pustules moins étendues et moins enflammées que lors de la première inoculation. L'ensemencement du sang du cœur prélevé sur l'animal vivant, alors que la température commençait déjà à s'atténuer (environ vingt-huit heures après l'inoculation) n'a donné aucun résultat, pas plus que l'inoculation au cobaye et à un autre chien. L'animal se rétablit rapidement dans la suite.

Il est donc à noter, après cette première expérience, que le chien réagit à l'inoculation intradermique de virus charbonneux, que la bactériémie apparaît environ vingt-quatre



Expérience I. — Pustules charbonneuses chez une chienne.



Expérience II. — Pustules charbonneuses chez le chien.

heures après l'inoculation et qu'elle est de courte durée. Il peut être intéressant de remarquer que la réaction de fixation a fourni une réponse négative vis-à-vis d'un antigène charbonneux.

EXPÉRIENCE II. — Le 19 octobre 1932, un chien (N° 2) de 11 kilos reçoit dans le derme, en six points différents, 3/4 de cc. d'émulsion dans 10 cc. de bouillon d'une culture totale de vingt-quatre heures sur gélose de la souche CH 15 X. L'acmé de la température est atteinte au quatrième jour, une prise de sang effectuée à cette date permet d'obtenir, après ensemencement, une culture pure de bactériidies charbonneuses. Les pustules observées sont plus vives et plus étendues que dans la première expérience. La température baisse dès le lendemain et le chien meurt en hypothermie le 25. A l'autopsie, tous les organes se montrent normaux, pas d'œdème sous-cutané, pas de splénomégalie. Par contre, on note une congestion hémorragique diffuse du tissu conjonctif sous-cutané et du péritoine. Les frottis de rate ne décèlent pas de bactériidies, la réaction d'Ascoli est positive. On isole la souche de deuxième passage : CH 25 X.

Deux chiens inoculés dans le derme avec 1 cc. 1/2 de sang virulent citraté provenant respectivement des chiens I et II ne manifestent aucun trouble.

Dans la suite, les inoculations intra-dermiques réalisées donnèrent toutes des résultats positifs. Voici, à titre d'indication, les résultats de nos injections.

EXPÉRIENCE III. — Le 23 octobre, la chienne 3, 11 kilos, inoculée dans le derme avec la souche CH 15 X, meurt en hypothermie au bout de quinze jours ; mêmes lésions que dans l'expérience précédente. Quelques rares bactériidies dans la rate.

EXPÉRIENCE IV. — Le 26 octobre, le chien 4, 13 kilos, inoculé dans le derme avec la souche CH 25 X, meurt en quarante-huit heures. Même observation, on isole la souche CH 28 X (troisième passage).

EXPÉRIENCE V. — Le 29 octobre, le chien 5, 8 kg. 200, inoculé dans le derme avec la souche CH 28 X, meurt en quatre jours. Même observation.

Les passages opérés strictement par la peau ont été arrêtés ici. Dans les expériences suivantes, nous avons recommencé à étudier la sensibilité du derme en utilisant la souche primitive déjà exaltée par deux passages chez des chiens inoculés par voie testiculaire.

EXPÉRIENCE VI. — Le 23 octobre, le chien 6, 6 kg. 500, inoculé dans le derme avec une souche CH 21 X T, meurt en quatre jours. Même observation. On isole la souche CH 27 X P.

EXPÉRIENCE VII. — Le 29 octobre, le chien 7, 6 kilos, inoculé dans le derme avec CH 27 X P, meurt en trente heures. Pas de lésions d'aucune sorte. On isole la souche CH 31 X P.

EXPÉRIENCE VIII. — Le 31 octobre, le chien 8, 11 kilos, reçoit dans le derme 2 cc. de sang virulent du chien 7. Il présente de fortes lésions locales et il meurt en quatre jours. A l'autopsie, on note des lésions caractéristiques de charbon (oedème sous-cutané gélatineux, rate normale, mais hémorragique). On isole la souche CH 4 XI P.

EXPÉRIENCE IX. — Le 4 novembre, la chienne 9, 13 kg. 100, inoculée dans le derme avec 2 cc. de sang du chien 8, meurt en trois jours. Même lésion que dans l'expérience VIII. On isole la souche CH 7 XI P.

EXPÉRIENCE X. — Le 8 novembre, le chien 10, 7 kg. 500, qui avait été traité auparavant par des injections intra-veineuses de formol à la dose quotidienne de 1 cc. pendant quatre ou cinq jours, inoculé dans le derme avec la souche CH 7 XI P, meurt en huit jours seulement, présentant à l'autopsie des lésions typiques de charbon. On obtient la souche CH 15 XI P. Une chienne inoculée dans le derme avec 2 cc. de sang virulent provenant de ce sujet n'a présenté aucun trouble.

EXPÉRIENCE XI. — Le 22 novembre, la chienne 11, 6 kg. 500, inoculée dans le derme avec CH 15 X P, meurt en sept jours. Lésions caractéristiques de charbon ; on isole la souche CH 29 XI P.

EXPÉRIENCE XII. — Le 2 décembre, la chienne 12, 5 kilos, inoculée dans le derme avec CH 29 XI P, meurt en dix jours. Lésions caractéristiques de charbon. On obtient la souche de septième passage CH 12 XII P.

Un fox de 9 kg. 750 inoculé dans le derme avec 1 cc. de sang virulent provenant du chien 12, ne manifeste aucun trouble.

D'autre part, la souche isolée du chien 12, septième passage par la peau, s'est révélée incapable de tuer par voie dermique un chien de 7 kilos. Par contre, elle tue en quatre jours un chien de 14 kg. 500 inoculé par voie testiculaire ; après ce passage, elle redevient susceptible de tuer par la voie cutanée, en soixante heures, le chien 17 de 6 kg. 500 ; puis, par la même voie, un chien de 11 kg. 600 (N° 18) en quatre jours, cependant que l'inoculation intra-dermique échoue sur un animal de 7 kg. 400.

Nous attribuons les échecs partiels de nos derniers passages à une résistance particulière des animaux en expérience. Il s'agissait de chiens de rue de race très commune, bâtardés.

Quoiqu'il en soit, nous pouvons conclure que :

1° Le derme chez le chien se montre sensible à l'infection charbonneuse et qu'il est possible de réaliser par cette voie des passages en série avec des doses relativement faibles de virus, et même à l'aide du sang virulent de chien charbonneux.

2° Même quand il résiste à l'infection, le chien présente une période septicémique et ne peut donc être considéré comme absolument réfractaire au charbon, mais comme un animal qui peut être atteint en fait d'une véritable maladie infectieuse, mais habituellement curable et à courte évolution. Les cas spontanés de charbon chez le chien en amènent d'ailleurs directement la preuve.

3° Dans les cas expérimentaux graves, les animaux meurent en état d'hypothermie après n'avoir accusé qu'une rapide et courte ascension thermique.

4° Les lésions relevées à l'autopsie ne sont caractéristiques de l'infection charbonneuse que lors d'une évolution longue de la maladie ; dans le cas contraire on note seulement une infiltration hémorragique du tissu conjonctif sous-cutané et du péritoine.

II. — Transmission expérimentale du charbon au chien par la voie testiculaire

A. — Passages en série

Nous avons vérifié dans une première série de recherches les assertions de SANI en ce qui concerne la sensibilité particulière du testicule du chien vis-à-vis de l'infection charbonneuse.

Nous avons réalisé neuf passages en série chez le chien sans avoir à enregistrer un seul échec sur des chiens de race commune et de poids variant de 6 à 17 kilos.

Les quantités inoculées étaient relativement faibles ⁽¹⁾ : soit 1/2 à 1 cc. d'une émulsion dans 10 cc. de bouillon d'une culture totale de vingt-quatre heures sur gélose, soit 2 cc. d'une culture de vingt-quatre heures sur bouillon, soit 2 à 3 cc. de sang virulent de chien mort de septicémie charbonneuse.

Dans les tous premiers passages la mort survient en deux ou trois jours, dans une période d'hypothermie faisant suite à une forte élévation de température. Les lésions observées sont discrètes, sauf une infiltration hémorragique du tissu conjonctif sous-cutané et du péritoine déjà notée antérieurement. On ne trouve que de rares bactériologies dans la rate.

Dès le quatrième passage l'animal meurt plus rapi-

(1) Il suffit parfois chez le chien parfaitement sain, de 1/2 cc. du II^e vaccin Pastorien pour tuer l'animal par la voie testiculaire.

dement, les écarts de température sont moins élevés, au moment de la mort la température est normale, alors qu'elle ne s'était élevée que de 1° au maximum, le plus souvent de quelques dixièmes seulement. On note des lésions plus significatives de charbon, en particulier au niveau de la rate.

Au sixième passage et aux suivants l'animal meurt en quinze à dix-huit heures et présente dès lors à l'autopsie une rate violette hypertrophiée friable.

Dans tous les cas les testicules sont fortement altérés et l'on y rencontre de nombreuses bactéridies.

A tous coups nous avons obtenu, à partir du sang du cœur, une culture pure de bactéridies charbonneuses.

Nous avons pu, en outre, faire quelques observations intéressantes :

1° Dès le premier passage par la voie testiculaire chez le chien, la bactéridie charbonneuse perd de sa virulence pour le cobaye puisque cet animal inoculé avec une culture obtenu à partir du sang du cœur de ce chien, n'est mort qu'en sept jours. Dans la suite, les inoculations au cobaye ne furent pas effectuées, nous préoccupant d'obtenir une bactéridie hypervirulente pour le chien, de façon à en étudier toutes les propriétés.

2° Par la voie testiculaire les inoculations à partir de sang virulent de chien se montrent plus actives (mort plus rapide, lésions plus étendues) qu'à partir des émulsions de bactéridies sur gélose, les cultures en bouillon elles-mêmes, quoique moins riches en éléments microbiens, étant également supérieures aux cultures sur gélose.

3° La présence dans les éléments virulents inoculés, même en quantité minime, de staphylocoques, exerce un pouvoir inhibiteur complet sur la virulence des bactéridies. L'action antagoniste du staphylocoque vis-à-vis de la bactéridie charbonneuse sur les animaux très résistants a d'ailleurs été déjà observée.

B. — Nouveaux passages. Etude des propriétés de la bactériidie charbonneuse passée en série sur le chien.

Certain de donner dorénavant à tous coups l'infection charbonneuse au chien par la voie testiculaire, nous avons, quelques mois plus tard, voulu étudier les caractères particuliers qu'était susceptible de prendre la bactériidie charbonneuse lors de passages en série chez le chien. Nous avons donc utilisé des doses plus considérables de virus (150 à 200 fois mortelles), de façon à amener une mort rapide des animaux en expériences. Avec ces doses élevées, nous avons obtenu, dès le quatrième passage, la mort régulière des chiens (sans distinction de poids ni de race) en quatorze ou vingt heures, quelquefois trente-six heures pour des sujets plus résistants.

Les animaux présentent dès lors à l'autopsie tous les signes caractéristiques du charbon ; œdème sous-cutané, rate hypertrophiée, hémorragies multiples en nappe ou congestion hémorragique de tous les tissus. Chaque fois nous avons isolé une souche de bactériidies charbonneuses qui nous servait à réaliser un nouveau passage. Dix passages successifs furent ainsi effectués, partant chaque fois d'une culture sur gélose et non directement du sang du cœur des sujets morts.

Nous avons pu faire quelques observations intéressantes en ce qui concerne les caractères culturels, la morphologie de la bactériidie et son pouvoir pathogène vis-à-vis du cobaye.

1° CARACTÈRE DES CULTURES.

Dès les premiers passages chez le chien, la bactériidie charbonneuse cultive en bouillon, en troublant uniformément le milieu et présentant à l'agitation des ondulations moirées, la culture est plus abondante,

plus épaisse que celle des échantillons ordinaires et, en particulier, la souche initiale ; elle n'a pas tendance à se déposer au fond du tube.

Sur gélose elle perd peu à peu ses caractères habituels, donne des colonies moins tourmentées, légèrement bombées, moins rugueuses, à bords réguliers non dentelés. A la longue et après quelques passages la bactériidie fournit une variété spéciale, lisse, peu épaisse, très humide, blanc porcelaine. Quelquefois même le développement à la surface de la gélose se fait soit par endroits, soit uniformément en gouttes de rosée, comme c'est le cas pour le streptocoque ou le bacille du rouget. Elle ne conserve pas toujours ces caractères par repiquages successifs et ne se stabilise pas à cette nouvelle forme. Il s'agit d'une variété « S » encore mal fixée de la bactériidie obtenue facilement après cinq ou six passages par le testicule chez le chien. Les phénomènes de dissociation microbienne, en ce qui concerne la bactériidie charbonneuse, sont déjà bien connus et nous y reviendrons tout à l'heure.

2° ASPECT MICROSCOPIQUE.

Observant systématiquement les germes isolés, on assiste petit à petit à la transformation de la bactériidie, longue, flexueuse, en chaînettes ou en articles allongés isolés, en des éléments toujours isolés d'abord, puis devenant plus petits, plus trapus et évoluant en définitive par une forme ovoïde accusée vers la forme coccus après être passé par diverses formes d'invololution, recourbées, en massues, etc... Parfois, les formes ovoïdes sont nettement bacillaires et fines. Ni sur le cadavre, ni sur les cultures nous n'avons observé la formation de capsules, souvent décrites comme une forme de résistance par les auteurs.

La transformation en coccus est quelquefois si accentuée qu'il est possible de confondre les éléments bactériens avec des microcoques venus souiller les cultures. Ces formes très raccourcies de la bactériidie

charbonneuse présentent une affinité moins considérable pour la coloration de Gram. De nombreux éléments se décolorent rapidement. Si la décoloration est un peu poussée, on obtient alors au microscope une préparation uniformément colorée en rose. Le même temps d'action de l'alcool-acétone n'influence pas d'une façon sensible la coloration d'une préparation faite à partir du deuxième vaccin pastorien par exemple.

Parfois même, il est inutile de prolonger le temps de décoloration pour observer le phénomène, car on se trouve en présence d'une véritable souche de bactériidies charbonneuses ne prenant pas le Gram. Cette modification très importante s'est particulièrement manifestée pour la souche de onzième passage. Quelle que soit la variété « R » ou « S » de cette souche, on obtient de petits éléments en coccus Gram négatif. Parallèlement, au contraire, une préparation de la souche initiale ou même de souches des premiers passages colorée dans les mêmes conditions de technique conserve ses affinités pour la coloration de Gram. Ce nouveau caractère est susceptible d'apparaître brusquement. Par exemple, la souche CH 3 VII de dixième passage, qui est formé d'éléments en coccus Gram positif, donne, après repiquage ou après nouveau passage chez le chien, les mêmes éléments, plus fins, nettement Gram négatif.

Le caractère est ici encore mal fixé puisque par de nouveaux passages ou repiquages les éléments peuvent reprendre avec activité la coloration de Gram. Nous sommes donc en présence d'une bactériдие charbonneuse tout à fait spéciale présentant le phénomène de réversibilité de la réaction de Gram.

3° SPORULATION.

Les souches de dixième et de onzième passages ne donnent pas des spores.

En résumé, par passages chez le chien on obtient

une variété de bactéridies charbonneuses de type « S » de forme très raccourcie et asporogène.

*Fixité et concordance des caractères cultureux
et microscopiques*

Etudiant plus spécialement la souche provenant du dixième passage chez le chien (CH 3 VII), nous avons pu nous rendre compte qu'à ce degré la bactéridie n'était pas encore fixée dans ses caractères biologiques et morphologiques.

La souche CH 3 VII est inoculée à titre d'épreuve à fortes doses, par voie testiculaire à sept chiens vaccinés antérieurement. Nous avons étudié plus spécialement deux souches isolées de deux chiens morts à la suite de l'inoculation d'épreuve. L'une, étiquetée CH 5 VIII, l'autre CH 7 VIII. Il s'agissait donc de bactéridies virulentes passées sur des animaux particulièrement résistants.

La souche CH 5 VIII (var. S), isolée du sang du cœur d'un chien vacciné (soit le onzième passage), donne directement sur gélose une variété « R » dentelée, sèche, rugueuse, constituée d'éléments en coccus, ne donnant pas de spores. Par repiquage, cette variété donne naissance, comme à la suite d'une mutation brusque, à une variété « S » asporogène comparable à la souche du dixième passage chez le chien. un deuxième repiquage redonne la variété « R ». La souche CH 7 VIII, comparable à la précédente quant à son origine, est encore une variété « S », mais qui présente à l'examen microscopique un mélange de coccus et de bâtonnets. Elle est asporogène. Par repiquage, on obtient toujours une variété « S », mais présentant brusquement des bâtonnets typiques, voire même en chaînettes, qui sont capables de donner des spores.

Notons, pour conclure, que les nouveaux caractères acquis par la bactéridie charbonneuse ne sont pas encore fixés définitivement au dixième passage chez

le chien. La bactéridie reste, en effet, capable de mutations ; d'autre part, il n'y a pas de parallèle entre la forme des éléments, la variété culturale et la capacité de donner des spores. Cependant, seules les formes en bâtonnets allongés seraient capables de sporuler.

4° POUVOIR PATHOGÈNE.

La souche CH 3 VII du dixième passage chez le chien inoculé à raison de 1 cc. d'une émulsion de 10 cc. de bouillon, d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose, à six cobayes, a provoqué la mort en cinq jours d'un seul cobaye ; tous les autres ont survécu. La souche isolée du seul cobaye mort (CH cob. 30 VII) est de type « S » accentué poussant par endroits en gouttes de rosée, elle est constituée d'éléments en coccus prenant mal le Gram. Cette souche repiquée tend à redonner nettement la variété « R ». Elle est asporogène et incapable de tuer de nouveaux cobayes.

D'autre part, les souches CH 5 VIII (variété « R » brusque et variété « S » secondaire) et CH 7 VIII (variété « S » en coccus puis en bâtonnets) étudiées précédemment, se montrent également incapables de provoquer la mort des cobayes inoculés.

Deux mois après son isolement, on inocule dans le testicule à forte dose la souche CH 3 VII (dixième passage chez le chien) à un chien neuf.

L'animal meurt en seize heures avec des signes manifestes de charbon. On isole et étudie cette bactéridie de onzième passage étiquetés CH 14 X. Elle se présente avec les caractères suivants : variété « S » très accentuée, éléments en bâtonnets ovoïdes excessivement courts, asporogènes. Par repiquage, elle donne directement une variété très proche du type « R » à éléments en bâtonnets très raccourcis. On en inocule une forte dose à quatre cobayes : deux par la voie sous-cutanée, deux par la voie intradermique. Deux de ces animaux résistent, deux autres succombent dont on isole une bactéridie encore semblable

à la souche initiale (variété « S » forme coccus, asporogène) qui est incapable de tuer à nouveau le cobaye.

Nous pouvons donc conclure que par passages successifs chez le chien la bactériodie charbonneuse voit sa virulence considérablement atténuée pour le cobaye au point de la perdre même en totalité. Toutefois, ce caractère n'est pas encore fixé au onzième passage par la voie testiculaire.

5° POUVOIR VACCINANT POUR LE COBAYE.

Des cobayes sont inoculés avec les différentes souches non pathogènes isolées des chiens, à l'aide de 1/2 cc. par la voie intradermique, 1 cc. par la voie sous-cutanée d'une émulsion dans 10 cc. de bouillon d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose (CH 3 VII, CH 14 X, CH 5 VIII, CH 7 VIII, CH cob. 30 VII). Deux animaux seulement succombèrent; tous les autres ont survécu.

Ils sont éprouvés quinze jours après (31 octobre 1933) avec 2/10 cc. de deuxième vaccin pastorien. On inocule en même temps quatre cobayes témoins.

Tous les cobayes moururent de charbon dans un délai variant de trois à cinq jours, les vaccinés disparaissant d'ailleurs avant les témoins. Cela est-il dû à une sensibilisation de l'animal ou à une infection latente réveillée par l'inoculation d'épreuve ? Quoiqu'il en soit, les souches de dixième et de onzième passage chez le chien sont incapables de donner l'immunité au cobaye.

Nous avons dans le tableau ci-après donné un résumé de l'ensemble de nos recherches.

VARIATIONS CULTURALES, MORPHOLOGIQUES I
CHARBONNEUSES PASSÉE EN SÉRIE P.

Souche CH 3 VII (10

Repiquage sur gélose :
forme ovoïde très mince.
Gram —.

variété « S » ;
forme ovoïde et
Gram +,
race asporogène,
tue irrégulièrement le cobaye pas

passage sur chien neuf

passages sur chiens vaccinés

CH 14 X (11^e passage)

variété « S » très accentuée,
forme ovoïde très mince.
Gram —.

Race asporogène,
tue irrégulièrement le cobaye,
ne le vaccine pas.

Repiquage sur gélose :
tend vers le type « R »

Gram —.
même forme ovoïde plus trapue.

Souche cobaye : variété « S » accentuée,
forme ovoïde mince,
Gram —.
asporogène,
ne tue pas le cobaye,
ne le vaccine pas.

CH 5 VIII (11^e passage)

variété « R »,
forme ovoïde et coccus,
Gram +.

Race asporogène,
ne tue pas le cobaye,
ne le vaccine pas.

Repiquage sur gélose :
variété « S »,
forme ovoïde et coccus,
Gram +.

Race asporogène,
ne tue pas le cobaye,
ne le vaccine pas.

T BIOLOGIQUES D'UNE SOUCHE DE BACTÉRIIDIES
R LA VOIE TESTICULAIRE CHEZ LE CHIEN.

e passage chez le chien)

COCCUS,

at le cobaye (1 sur 6),

→ souche CH cob. 30 VII,
variété « S » très accentuée,
forme ovoïde et coccus,
prenant mal le Gram,
race asporogène,
ne tue pas le cobaye,
ne le vaccine pas.

repiquage sur gélose :
tend à prendre le type « R ».

CH 7 VIII (11^e passage)

variété « S »,
forme bâtonnets et éléments ovoïdes et coccus
Gram +.
Race asporogène,
ne tue pas le cobaye,
ne le vaccine pas.

repiquage sur gélose :
variété « S »,
forme bâtonnets typiques,
Gram +.
race sporogène,
ne tue pas le cobaye,
ne le vaccine pas.

III. — Présence de bactériidies charbonneuses dans l'intestin de chiens ayant ingéré des cadavres charbonneux

Caractères de la bactériдие isolée

La difficulté que comporte l'étude expérimentale du transport des bactériidies charbonneuses par le chien, lors l'ingestion de produits virulents, consiste précisément à faire absorber au sujet du matériel sûrement infecté : viande, viscères, sang d'animaux charbonneux, dont nous étions démunis. Or, le chien, en général, répugne à dévorer un cadavre de cobaye et c'est le seul élément de contagé que nous avions à lui proposer. Chaque fois que nous avons essayé de faire avaler à un chien sain, bien nourri, un cobaye fraîchement tué ou conservé vingt-quatre heures encore après la mort, nous avons échoué dans notre tentative. Après de multiples essais, le seul moyen qui nous parut efficace, et, nous le reconnaissons, tant soit peu barbare, consiste à laisser jeûner l'animal pendant trois à quatre jours et à lui jeter, au bout de ce temps, le cadavre mort de septicémie charbonneuse. L'animal affamé se jette alors sur le matériel infecté et le dévore en entier.

Après l'ingestion par le chien d'un ou de deux cobayes charbonneux, nous avons recherché systématiquement, à plusieurs jours d'intervalle, les spores

charbonneuses dans les excréments des animaux en expérience. Nous avons utilisé, pour ce faire, la technique suivante :

Trente grammes d'excréments de chien sont placés dans trois verres stériles à raison de 10 grammes par verre. Les verres contenaient au préalable un milieu relativement pauvre pour les bactéries étrangères à la bactérie charbonneuse, mais suffisant pour cette dernière, savoir : une dilution de 1/20 en eau physiologique de bouillon de viande peptoné ordinaire. Au moyen d'un agitateur stérile on fait une dilution de matières excrémentielles dans le liquide et on laisse le tout en contact une demi-heure à la température du laboratoire. Au bout de ce temps, les éléments solides se sont déposés dans le fond du verre ; on décante le liquide surnageant que l'on transvase dans un tube stérile de centrifugeuse. Après centrifugation, le culot obtenu estensemencé dans un tube de bouillon porté à l'étuve, réglée à 43° pendant deux heures.

On sait que cette température empêche toutes les cultures en voie de développement sans toucher aux spores charbonneuses. Le tube est porté ensuite dix minutes au bain-marie à 75°, et, après refroidissement, on ensemence trois à quatre tubes de gélose inclinée à l'aide d'une goutte de bouillon, de façon à obtenir, le cas échéant, des colonies isolées.

Les expériences ont été effectuées sur trois chiens et ont permis de faire quelques constatations intéressantes, aussi bien en ce qui concerne la durée du pouvoir infectant des excréments de chien que la virulence et la morphologie des bactéries charbonneuses retrouvées. Nous avons utilisé chaque fois la même souche de bactéries charbonneuses, à savoir celle qui nous a servi de point de départ, non transformée encore par passages successifs sur l'organisme du chien. Nous donnons ci-dessous le résumé de nos expériences.

EXPÉRIENCE I. — Le 11 octobre 1932, un chien à jeun depuis le 6 octobre, dévore un cobaye frais mort le matin même de septicémie charbonneuse. Le lendemain du repas infectant, on note une légère élévation de la température (39°5), qui redevient et reste normale dans la suite (38°5). On procède, comme il est indiqué plus haut, à la recherche des éléments pathogènes dans les excréments. Cette recher-

che est positive. La culture et l'examen bactérioscopique montrent une bactéridie typique, en bâtonnets, qui tue le cobaye en quarante-huit heures.

Une nouvelle recherche est effectuée le 17, soit six jours après l'ingestion. La culture et l'examen bactérioscopique présentent une bactéridie typique quant à sa morphologie. Toutefois, l'inoculation au cobaye ne permet pas de porter un diagnostic certain immédiat, l'animal d'expérience ne succombant qu'au septième jour après l'inoculation. Les signes nécropsiques indiquent bien une mort par septicémie charbonneuse; d'autre part, la culture du sang du cœur fournit une bactéridie absolument caractéristique.

Nous n'osons pas tout d'abord imputer le retard observé dans la mort du cobaye à une atténuation de la virulence de la bactéridie par passage dans l'intestin du chien. Cependant, des faits ultérieurs devaient justifier une telle hypothèse.

EXPÉRIENCE II. — Le 20 octobre, une expérience comparable nous permet encore de retrouver la bactéridie charbonneuse six jours après l'ingestion par un autre chien de deux cobayes morts depuis quarante-huit heures de septicémie charbonneuse et, par conséquent, riches en spores. L'animal en expérience s'évade du laboratoire et il est impossible de pousser plus loin la recherche des spores dans les matières fécales. Nous entreprenons, de ce fait, un troisième sujet.

EXPÉRIENCE III. — Le 3 avril 1933, nous faisons dévorer par un chien à jeûn le cadavre frais d'un cobaye mort de charbon, l'animal est laissé en observation en vue de recherches éloignées.

Le 5 juillet, soit plus de trois mois après l'ingestion, on recherche les spores charbonneuses dans les excréments.

A. — Sur gélose, une seule colonie se développe, dont l'aspect morphologique peut faire penser à la bactéridie charbonneuse, colonie cependant moins visqueuse et à contours réguliers. A l'examen bactérioscopique, celle-ci se présente en bâtonnets isolés plus courts que les exemplaires habituels. Le 7 juillet, son inoculation au cobaye (N° 24) reste sans résultat, ce qui ne laisse pas de nous étonner. D'autre part, la culture provenant du repiquage étant portée par erreur à une forte température, il ne nous est pas possible, les bactéries étant détruites, de l'étudier plus à fond.

B. — Il nous restait une culture en bouillon de même origine dont on inocule, le 26 juillet, 1 cc. 1/2 à un cobaye (N° 25), dans le but d'isoler, à coup sûr, la bactéridie. On effectue, d'autre part, un ensemencement sur boîte de Pétri, à partir de cette culture en bouillon :

1° Le cobaye inoculé meurt en quarante-huit heures sans présenter à l'autopsie de signes de charbon. L'ensemencement du sang du cœur donne sur bouillon une culture très abondante troublant le milieu, donnant à l'agitation des ondulations moirées et n'ayant pas de tendance à se déposer au fond du tube. Sur gélose, on note des colonies régulièrement arrondies, lisses, peu épaisses, d'un blanc porcelaine, ressemblant davantage à une culture de staphylocoques qu'à une colonie de bactéridies charbonneuses.

On rencontre sur ces milieux des éléments de formes variées allant d'un coccus, ressemblant à s'y méprendre à une variété de sarcine, jusqu'à des bactéries courtes, trapues, ovoïdes, tous ces types restant colorés par la méthode de Gram, mais se décolorant de façon relativement facile si on laisse agir un peu trop longtemps l'alcool-acétone, voire même tout simplement l'alcool absolu.

Nous sommes donc en présence d'une variété « S » de bactéridies charbonneuses morphologiquement comparables à celle obtenue après passage en série par la voie testiculaire chez le chien.

Cette souche ne donne pas de spores. Elle est inoculée, après repiquage, le 14 octobre (deux mois et demi après l'isolement) à deux cobayes, l'un (A 40) par la voie intradermique (1/2 cc. d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon), qui ne succombe pas ; l'autre (B 60) par la voie sous-cutanée (1 cc.), qui meurt en trois jours (1) et permet de retrouver les mêmes éléments que ceux décrits plus haut. Cependant, les cultures obtenues sur gélose sont moins lisses, un peu plus tourmentées et dentelées et ont une tendance légère à reprendre le type « R ». Les bactéridies très courtes, déjà observées, sont en plus grand nombre par rapport aux sphères rencontrées à l'examen bactérioscopique, et ces différentes formes restent bien colorées par la méthode de Gram.

(1) Il nous semble intéressant de noter que, manquant d'autres animaux, nous avons été obligés d'utiliser pour cette inoculation un animal en très mauvais état physiologique et par conséquent beaucoup moins résistant.

Cette souche ne donne pas davantage de spores. Elle est réinoculée à un cobaye neuf (B 3), qui succombe en vingt-quatre heures et fournit une culture pure de bactériodie très courte prenant le Gram et présentant sur gélose un aspect se rapprochant de plus en plus du type « R ». Elle fournit des spores qui donnent naissance à des éléments plus allongés, mais non encore caractéristiques de la bactériodie charbonneuse.

2°. Sur boîte de Pétri, on obtient des colonies assez caractéristiques, mais tendant cependant vers le type « S » et présentant de gros et courts bâtonnets associés à quelques rares éléments allongés en chaînettes, prenant le Gram. Cette souche ne donne pas de spores. Le repiquage sur gélose fournit une variété « S » cultivant par endroits en « gouttes de rosée » et présentant au microscope des bactéries très courtes comparables à celles décrites plus haut (pas de coccus ni de chaînettes). Cette culture ne donne pas de spores et ne tue pas un cobaye (B. 2) inoculé le 19 octobre, après repiquage.

Cette souche nous paraît donc comparable à celle décrite plus haut (A) isolée directement sur gélose et que nous n'avons pu étudier. Elle prend, par simple repiquage, un aspect spécial (variété « S », formes très courtes) que nous connaissons déjà.

Notre chien d'expérience est mort accidentellement par la suite et ne nous a pas permis de continuer les recherches entreprises sur lui.

En résumé : 1° Il est possible de trouver encore au bout de trois mois des bactériodies dans les excréments des chiens ayant absorbé des cadavres charbonneux.

2° Nous avons isolé, dans les matières excrémentielles, deux variétés instables de bactériodies, l'une intermédiaire entre les types « R » et « S », à éléments encore longs, asporogènes, susceptibles par repiquage de donner un type « S » à éléments courts, asporogènes non pathogène pour le cobaye ; l'autre de type « S » immédiat, à éléments courts, asporogène, tuant irrégulièrement le cobaye, susceptible, après deux passages, de récupérer sa virulence pour cet animal, de redonner des spores, des éléments plus allongés et une variété tendant de nouveau vers le type « R ».

Les cobayes B 2 et A 40 qui n'ont pas succombé aux inoculations sont éprouvés le 30 octobre par la voie sous-cutanée, à l'aide de 2/10 cc. de deuxième vaccin pastorien. On inocule également deux cobayes témoins. Les quatre cobayes succombent en même temps à l'infection charbonneuse. Cette souche ne vaccine donc pas le cobaye.

IV. — Discussion et interprétation des résultats

Nous avons donc mis en évidence, dans les recherches précédemment relatées, cinq modifications principales de la bactéridie charbonneuse :

- 1° Raccourcissement considérable de la bactéridie ;
- 2° Transformation en race asporogène ;
- 3° Perte du pouvoir pathogène pour le cobaye ;
- 4° Dissociation en deux variétés « R » et « S » ;
- 5° Réversibilité de la réaction de Gram.

La transformation de la bactéridie en une forme très courte a déjà été signalée par différents auteurs.

MARTEL l'a noté au cours d'expériences semblables, à la suite de passages en série chez le chien. Mais alors que, pour cet auteur, il s'agit d'une variété « susceptible de se perpétuer par les cultures successives en bouillon nutritif, en passant par le spore et qui a une tendance très nette à donner naissance à la forme filamenteuse lorsqu'on la transplante sur les milieux solides telle que la gélose », nous avons, au contraire, constaté simultanément cette transformation et sur les milieux liquides et sur la gélose. Le repiquage sur gélose ne fait qu'accentuer, au contraire, ce caractère, qui, bien fixé, ne l'est cependant pas d'une manière définitive, certaines variations brusques pouvant se produire et ramener dans certains cas dans les cultures (à la suite de passages chez le chien par exemple ou, quand cela est possible encore chez le cobaye) des formes en bâtonnets allongés. Pour nous, d'autre part, un autre caractère nouveau semble

fixé, avec les mêmes restrictions que plus haut : la qualité asporogène de cette nouvelle race.

PHISALIX, en 1900, a déjà signalé le fait après culture dans l'organisme du chien. Antérieurement, dans ses remarquables études sur la variabilité du bacillus anthracis, CHAUVEAU avait déjà vu que dans les cultures atténuées on trouvait fréquemment à côté des formes mycéliennes typiques, des formes anormales, soit par la brièveté des éléments, soit par la minceur des bacilles et la disposition caractéristique des spores à l'extrémité du bâtonnet, disposition qui donne à ce bâtonnet la forme d'un clou. Il s'agit, dans ce dernier cas, d'une variété capable d'acquérir une grande stabilité. En effet, si l'on inocule un cobaye avec un des vaccins atténués de CHAUVEAU, et qu'au bout d'un certain temps on enlève les ganglions voisins du point inoculé pour les ensemençer dans du bouillon, on obtient le plus souvent des cultures pures de la nouvelle race qui a été désignée sous le nom de *B. anthracis claviformis*.

Or, il arrive qu'à côté de cette forme bacillaire et sporulée on rencontre des granulations arrondies, isolées ou associées en forme de diplocoques, de streptocoques, qui ont bien un lien de parenté avec le bacille charbonneux. PHISALIX, en effet, a vu que dans l'organisme du chien, la bactériémie subit des modifications importantes. Elle débute par des troubles dans les fonctions du microbe, qui perd sa virulence. Puis la forme varie à son tour et s'adapte à la fonction ; ce qui la caractérise, c'est le raccourcissement considérable du bourgeon végétatif, marchant de pair avec une segmentation rapide et complète, pour donner des articles isolés semblables à des microcoques, d'où le nom de *B. anthracis brevigemmans*.

Il est à noter que ces résultats avaient été obtenus non pas par passages chez le chien, mais par cultures en sacs de collodion *in vivo*.

Or, nous avons obtenu les mêmes résultats par passages en série par la voie testiculaire. Nous avons

noté également la perte de la virulence de la bactériodie pour le cobaye. Au onzième passage, cette perte de la virulence n'est encore pas totale, mais ne souffre cependant que de rares exceptions. L'inoculation de cette souche nouvelle par la voie sous-cutanée et intradermique ne donne cependant pas l'immunité au cobaye.

La dissociation de la bactériodie charbonneuse en deux variétés a déjà été étudiée par de nombreux expérimentateurs.

MARKOFF a signalé le fait en 1912. Plus récemment, NUNGESTER a montré qu'il était possible d'obtenir soit dans des conditions de culture spéciales, soit par des repiquages ou même des passages sur le cobaye et les souris, des types variables de la bactériodie charbonneuse susceptibles d'être eux-mêmes dissociés dans des conditions de culture déterminées.

Il existe deux types, l'un formé de colonies rugueuses irrégulières opaques, désignés par la lettre « R » (rough), l'autre à colonies lisses, régulières, transparentes, appelées « S » (smooth). Entre ces deux types on peut observer toutes les variétés RP. et SP. donnant de fines et petites colonies RM. et SM. ayant un aspect mucoïde.

Nous avons montré dans le cours de notre exposé que par passage par la voie testiculaire chez le chien nous avons obtenu la transformation du type « R » en type « S » et noté ces intermédiaires (cultures en goutte de rosée, type « S », tendant à reprendre le type « R »). Comme l'a déjà remarqué SCHOCKAERT, nous avons constaté que le type « S » était assez instable et se transformait sous certaines influences (passage, repiquage sur gélose) en type « R », lui-même, en ces conditions, peu fixe. NUNGESTER signale, par ailleurs, la présence de formes courtes en coccus, dans les souches de type « S ». Ceci est en accord avec nos constatations, bien que nous ayons pu obtenir une variété « S » composée d'éléments en bâtonnets

typiques, et une variété « R » à éléments ovoïdes très courts.

Pour cet auteur, toutes les variétés sont sporogènes; cependant, il a trouvé des bactéridies asporogènes dans les types mucoïdes. De notre côté, nous n'avons observé, au contraire, que des variétés asporogènes, non encore fixées, il est vrai, au dixième passage, puisqu'une variété « R » s'est montrée asporogène alors qu'un type « S » a fourni des spores.

La virulence diminuerait, selon NUNGESTER, pour toutes les formes modifiées du type « R ». Quant aux souches de type « R » dérivées du type initial, elles ont conservé intact le pouvoir de tuer les souris et les cobayes. GRATIA, étudiant la virulence de la bactéridie charbonneuse, observe de même sa dissociation en deux types : le type « diffus » (correspondant au type « S ») se montre bien moins virulent que le type « agglutiné » (correspondant au type « R »).

Nous avons fait des constatations analogues puisque nos souches de dernier passage, de type « S » accentué sont avirulentes pour le cobaye même à très forte dose. Le caractère n'est pas fixé définitivement, pour la forme « S ». A fortes doses celle-ci est capable encore, exceptionnellement, de tuer le cobaye (une fois sur six par exemple). Rappelons aussi qu'une variété « R » apparue brusquement au cours des passages (sur chien vacciné) ne tuait pas le cobaye.

En ce qui concerne l'origine de la transformation des variétés « R » en variété « S », il a été signalé que cette dernière forme pouvait être obtenue par l'ensemencement sur milieux neufs de prélèvements effectués au niveau de « trous » ou de « plages », rencontrés dans des cultures âgées ou chauffées. Le phénomène s'apparentait donc à un processus de bactériophagie. Mais comme il a été impossible, à partir de ces plages, d'obtenir la lyse en série des bactéridies, PESCH, puis SHOKICHI KATZU, qui les ont observées, refusent de considérer le phénomène comme la manifestation d'un bactériophage, mais le dénom-

ment pseudo-bactériophagie. Cependant, LEMOS MONTEIRO signale avoir obtenu un principe susceptible de lyser en série les bactéridies, mais non les spores. Pour DARANYI, il s'agirait non d'un bactériophage, mais de ferments isolytiques spécifiques dont la production serait liée à une sporulation intensive ; il confirme par là-même l'opinion de MONTEIRO. Pour nous, s'il y a un rapport entre les mutations observées et l'existence d'un principe lytique quelconque, le phénomène ne saurait être lié à la production de spores puisque nos souches se sont montrées, dans tous les cas, asporogènes.

Enfin, la réversibilité de la réaction de Gram que nous avons observée, a été notée et provoquée par W. CHURCHMAN. Ce changement s'accompagne d'une diminution de 40 % du diamètre des bactéridies et d'une diminution de poids. C'est par l'addition de colorant en petite quantité à de jeunes cultures que l'auteur a obtenu ces résultats. En général, seules les bactéries qui donnent des spores sont sensibles aux colorants. Il en résulte, comme il est déjà connu, que la substance centrale de la bactéridie charbonneuse serait négative au Gram.

De tout ce qui précède, il semble donc bien résulter que dans l'organisme du chien la bactéridie, inoculée par voie testiculaire, est soumise à des influences qui, sans empêcher l'augmentation de son pouvoir pathogène pour cette espèce, semblent provoquer sur elle des phénomènes comparables à des processus dégénératifs.

Enfin, nous pensons être le premier à signaler que les modifications observées se produisent non seulement à la suite d'inoculations parentérales de virus charbonneux chez le chien, mais aussi après un séjour prolongé (trois mois dans nos expériences) de la bactéridie ou de ses spores dans le tube digestif du chien.

V. — Immunisation des chiens par diverses voies

Dans le but de nous assurer de la sensibilité de certains tissus chez le chien vis-à-vis de la bactériémie charbonneuse, partant de ce principe émis par BESREDKA que la voie d'introduction du virus est la voie d'introduction du vaccin, nous avons recherché quel tissu était le plus capable, après l'inoculation vaccinale, d'assurer l'immunité du sujet.

L'expérience est possible puisque par la voie testiculaire il est possible de donner au chien l'infection charbonneuse à tout coup.

Les animaux furent inoculés d'abord à l'aide du deuxième vaccin pastorien et éprouvés quinze jours à un mois après, à l'aide d'une forte dose de bactéries charbonneuses hypervirulentes pour le chien par la voie testiculaire.

EXPÉRIENCE I. — On procède à la vaccination de sept chiens dans les conditions suivantes :

1° Le 11 mai, deux chiens (6 kilos et 7 kg. 400) reçoivent dans la peau $\frac{3}{4}$ de cc. de deuxième vaccin.

2° Le 11 mai, un chien (8 kilos) reçoit sous la peau 1 cc. de deuxième vaccin.

3° Le 11 mai, un chien (21 kilos) reçoit dans le muscle 1 cc. de deuxième vaccin.

Le 21 mai, un chien reçoit dans le muscle 1 cc. de deuxième vaccin.

4° Le 21 mai, deux chiens (6 kg. 300 et 8 kilos) reçoivent dans le testicule 1 cc. de deuxième vaccin.

Tous les chiens sont éprouvés le 12 juin par inoculation dans le testicule de l'émulsion totale dans 5 cc. de bouillon d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose de la souche de *huitième* passage chez le chien. Cette quantité représente une dose environ vingt ou trente fois mortelle pour le chien.

Seuls résistèrent à l'inoculation virulente un chien vacciné par la voie testiculaire et un chien vacciné par la voie sous-cutanée. Tous les autres succombèrent dans un délai de vingt-quatre heures à six jours (soixante heures en moyenne).

EXPÉRIENCE II. — On recommence l'expérience dans les conditions suivantes, le 12 juillet :

1° Deux chiens (9 kilos et 9 kg. 500) reçoivent par la voie intradermique 1 cc. de deuxième vaccin pastorien.

2° Deux chiens (10 et 11 kilos) reçoivent par la voie musculaire 2 cc. de deuxième vaccin.

3° Deux chiens (23 kilos et 12 kg. 500) reçoivent dans le testicule 2 cc. de deuxième vaccin.

4° Un chien reçoit par voie sous-cutanée 2 cc. de deuxième vaccin.

Les animaux sont éprouvés dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente, le 4 août.

Seuls survécurent à l'inoculation virulente :

Deux chiens vaccinés par la voie intradermique.

Un chien vacciné par la voie testiculaire.

Il peut être intéressant de noter ici que le temps de survie le plus long parmi les animaux ayant succombé à l'inoculation d'épreuve a été obtenu dans ces expériences chez un chien vacciné par la voie intradermique (six jours) et chez un chien vacciné par voie testiculaire (huit jours).

EXPÉRIENCE III. — Le 16 octobre, on vaccine un chien par la peau à l'aide de 1 cc. de deuxième vaccin (chien de 6 kilos), et deux chiens (18 et 21 kilos) par la voie testiculaire avec la même dose.

Les trois sujets sont éprouvés toujours dans les mêmes conditions, le 6 novembre.

Ces chiens ont survécu, alors que deux chiens témoins inoculés le même jour avec des quantités inférieures moururent en quatre jours.

Il ressort de ces expériences que la voie musculaire est incapable de donner au chien une immunité solide.

L'inoculation du vaccin par les voies dermique et testiculaire protège, au contraire, les sujets contre une injection d'épreuve excessivement sévère.

La voie sous-cutanée a été peu étudiée ; elle semble capable d'assurer une certaine protection.

Si donc, comme l'affirme SANI, le tissu musculaire, chez le chien, se montre sensible à l'infection charbonneuse, il ne constitue pas la voie élective de pénétration de la bactériémie, celle-ci étant constituée essentiellement par les voies dermique et testiculaire qui se montrent d'une sensibilité d'ailleurs à peu près égale, comme nous l'ont déjà montré nos expériences de transmission de la maladie au chien.

Conclusions

I. — La voie intradermique et la voie testiculaire se montrent très sensibles à l'infection charbonneuse chez le chien.

La maladie peut être donnée par l'une et l'autre voie, sans artifice, à l'aide d'une quantité relativement faible d'une bactériodie très virulente. La voie testiculaire se montre cependant plus sûre et amène plus rapidement la mort.

Les signes anatomo-pathologiques de l'infection chez le chien sont souvent différents de l'infection naturelle chez les autres animaux et se manifestent tout particulièrement par des hémorragies organiques diffuses.

II. — Il est donc facile d'exalter la virulence d'une bactériodie pour le chien, par passages en série sur cet animal.

Les passages en série par la voie testiculaire entraînent, chez la bactériodie, des modifications importantes :

- 1° Raccourcissement considérable de la bactériodie.
- 2° Transformation en race asporogène.
3. Perte du pouvoir pathogène pour le cobaye.
4. Dissociation en deux variétés « R » et « S ».
- 5° Réversibilité de la résection de Gram.

Ces caractères ne sont pas définitivement fixés au dixième et onzième passage chez le chien.

III. — Il est possible de trouver encore, au bout de trois mois, des bactéridies charbonneuses dans les

excréments des chiens ayant ingéré des cadavres charbonneux. Après ce séjour dans l'intestin du chien, la bactériodie présente des modifications analogues à celles observées lors des passages en série par voie testiculaire.

IV. — Une forte immunité anticharbonneuse est obtenue chez le chien par les voies cutanée et testiculaire. On ne peut obtenir une solide immunité par la voie musculaire.

Vu :

LE DOYEN,
ROUSSY.

Vu :

LE PRÉSIDENT,
DEBRÉ.

Vu et permis d'imprimer

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
S. CHARLETY.

Bibliographie

- APOSTOLEANO et JONESCU. — Un cas clinique de charbon externe chez le chien. (*Arch. Vét.*, 1923, XVII, N^{os} 4-5.)
- BROTZU. — Sur le passage de la bactériémie charbonneuse à travers l'intestin du chien. (*Ufficiale sanitario*, 1896, 342.)
- CERRUTI. — Sur la modification de la réceptivité du chien au charbon bactérien avec les extraits d'organes. (*G. di Batt et Immun.*, 1931, VII, 383.)
- CHAUVEAU et PHISALIX. — Une nouvelle variété de bacille charbonneux. (*C. R. Ac. des Sciences*, 1895, CXX, 801.)
- CHURCHMAN. — La structure de *B. anthracis* et la réversibilité de la réaction de Gram. (*Journal of Exp. Med.*, 1917, XVI, 1007.)
- DARANYI. — Ferment lactique dans la pseudo-bactériophagie de la bactériémie charbonneuse. (*Cent. f. Bak.*, 1917, CII, 326.)
- GRATIA. — Variations microbiennes et infection charbonneuse. (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 1924, XCV, 369.)
- HEYGELI. — *Allat. Lapok*, 1931, 185.)
- JONESCU. — Un cas de charbon chez le chien. (*Archiv. Vétér.*, 1922, XVI, N^o 4.)
- SHOKIGHI KATZU. — Phénomènes analogues à la bactériophagie chez la bactériémie charbonneuse. (*Cent. f. Bak.*, 1925, XCVI, 281.)
- LANFRANCHI et CASALOTTI. — Infections cutanée et intratesticulaire dans la fièvre charbonneuse. (*La Nuova veterinaria*, 1925, II, 125.)

- MALM. — Sur la virulence de la bactériodie charbonneuse après passage chez le chien et chez le lapin vacciné. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1980, IV, 520.)
- MARTEL. — Le charbon du chien. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, XIV, 13.)
— Le charbon du chien. (Thèse Doctorat ès-Sciences, Paris, 1890.)
- MARKOFF. — (Cité par Gratia). (*Zeitsch. f. Infekt. der Haustiere*, 1912, XII, fasc. 2.)
- LEMONS MONTEIRO. — Les différentes phases de l'autolyse du *Bacillus Anthracis*. (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 1925, XCIII, 975.)
- NUNGESTER. — Dissociation of *Bacillus Anthracis*. (*Journ. of Infectious Disease*, 1919, XLIV, 73.)
- PESCH. — Pseudo bactériophagie de la bactériodie charbonneuse. (*Cent. f. Bak.*, 1924, XCIII, 525.)
- PHISALIX. — Sur une variété de bacille charbonneux à forme courte et asporogène : *Bacillus Anthracis brevigemmans*. (*C. R. Ac. de Sciences*, 1900, CXXXI, 424.)
- PIJOAN. — (*J. of Exp. Med.*, 1931, LIII, 37.)
- SANI. — Du charbon expérimental chez le chien. (*La Clinica veterinaria*, 1925, XLVIII, 485.)
— Le chien dans la propagation de la fièvre charbonneuse. (*La Clinica veterinaria*, 1917, XL, 315.)
- SCHOCKAERT. — Influence des sérums homologues sur les mutations des types « R » et « S » chez le *bacillus anthracis*. (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 1929, C, 760.)

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos	9
Introduction	13
I. — Transmission expérimentale du charbon au chien par la voie cutanée.....	17
II. — Transmission expérimentale du charbon au chien par la voie testiculaire. Caractères de la bactéridie	23
III. — Présence de bactéridies charbonneuses dans l'intestin de chiens ayant ingéré des ca- davres charbonneux. Caractères de la bactéridie	31
IV. — Discussion et interprétation des résultats	37
V. — Immunisation des chiens par diverses voies	43
Conclusions	47
Bibliographie	49

